

UNIVERSITÉ DE PARIS

ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Année 1912-1913.

N° 14

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE
L'ACTION SYNTHÉTISANTE de l'ÉMULSINE

Action de l'Émulsine sur le Glucose en solution
dans l'alcool méthylique.

THÈSE

Pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

Présentée et soutenue le 7 Juillet 1913.

PAR

Ém. VERDON

PHARMACIEN DE PREMIÈRE CLASSE

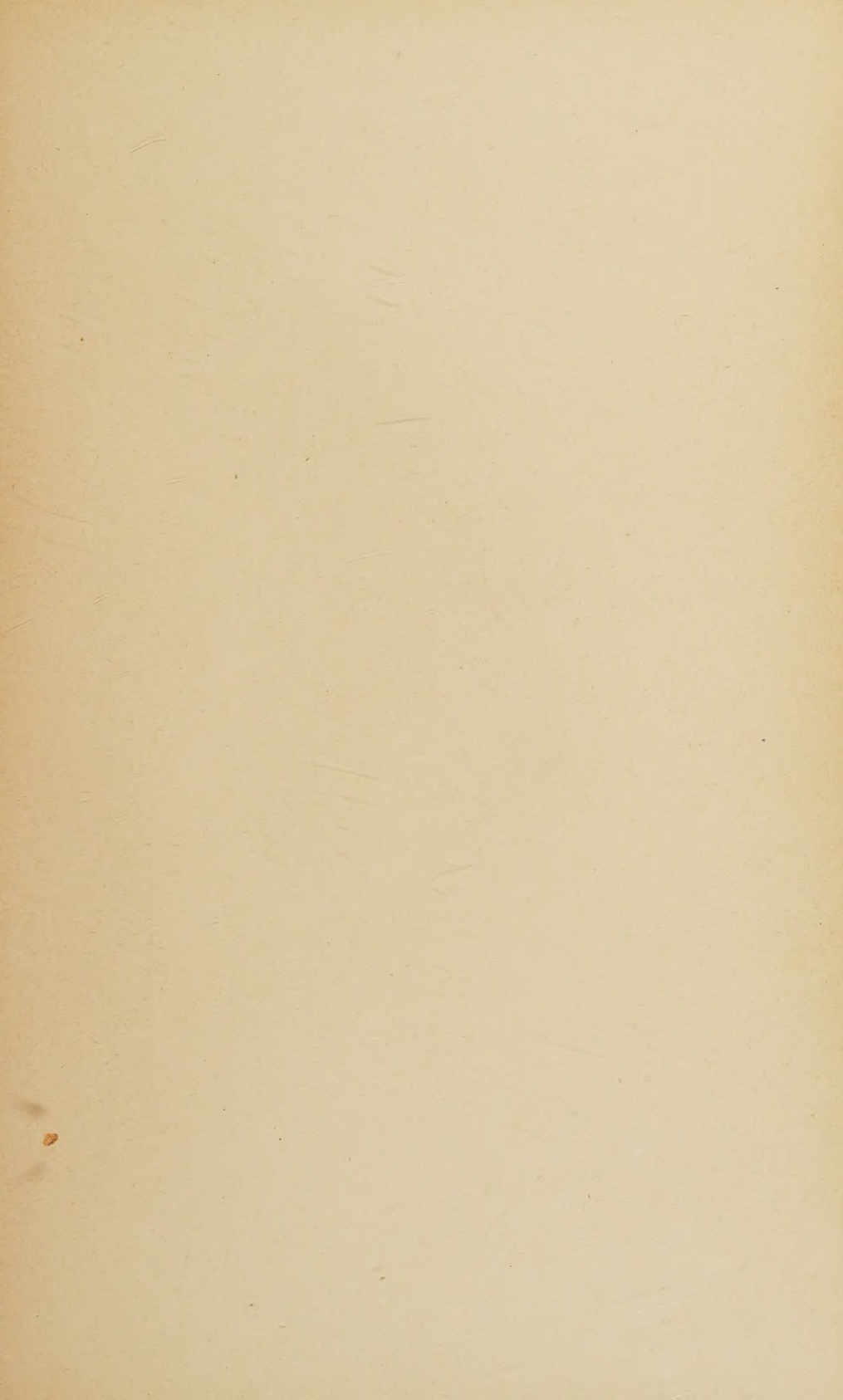
INTERNE DES HÔPITAUX DE PARIS.

JURY { MM. BOURQUELOT, Président.
MOUREU, Professeur.
HÉRISSEY, Agrégé.

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME

—
1913



UNIVERSITÉ DE PARIS

ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Année 1912-1913.

N° 14

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

DE

L'ACTION SYNTHÉTISANTE de l'ÉMULSINE

Action de l'Émulsine sur le Glucose en solution
dans l'alcool méthylique.

THÈSE

Pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

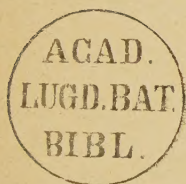
Présentée et soutenue le Juillet 1913.

PAR

Ém. VERDON

PHARMACIEN DE PREMIÈRE CLASSE

INTERNE DES HÔPITAUX DE PARIS.



JURY

MM. BOURQUELOT, Président.
MOUREU, Professeur.
HÉRISSEY, Agrégé.

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME

1913

PERSONNEL DE L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. GAUTIER, Directeur, *, 🌿 I.
BOURQUELOT, Assesseur, *, 🌿 I.
E. MUSSON, Secrétaire, *, 🌿 I.

PROFESSEURS

MM. GUIGNARD, Membre de l'Institut, O. *, 🌿 I. Botanique générale.
VILLIERS, *, 🌿 I. Chimie analytique.
BOURQUELOT, *, 🌿 I. Pharmacie galénique.
GAUTIER, *, 🌿 I. Chimie minérale.
RADAIS, *, 🌿 I. Cryptogamie.
BÉHAL, O. *, 🌿 I. Chimie organique.
PERROT, *, 🌿 I. Matière médicale.
COUTIÈRE, *, 🌿 I. Zoologie.
BERTHELOT, 🌿 I. Physique.
GRIMBERT, *, 🌿 I. Chimie biologique.
MOUREU, Membre de l'Institut, *, 🌿 I. Pharmacie chimique.
LEBEAU, 🌿 I. Toxicologie.
DELÉPINE, 🌿 I. Minéralogie et Hydrologie.

Directeur honoraire : M. GUIGNARD, O. *, 🌿 I.

Professeurs honoraires : MM. JUNGFLEISCH, O. *, 🌿 I.
et BOUGHARDAT, O. *, 🌿 I.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. GUERBET, 🌿 I.	MM. GUÉRIN, 🌿 I.
VALEUR, 🌿 A.	GUÉGUEN, 🌿 I.
BOUGAULT, 🌿 A.	LUTZ, 🌿 I.
TASSILY, 🌿 I.	HÉRISSEY, 🌿 I.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DEFACQZ, 🌿 I. Chimie générale.
COUSIN, 🌿 I. Chimie analytique.
SOUÈGES, 🌿 A. Micrographie.
MOURLOT, 🌿 I. Physique.
BARTHELAT, 🌿 I. Microbiologie.

Chef du Laboratoire des examens pratiques : M. JAVILLIER, 🌿 A.

Bibliothécaire en Chef : M. DORVEAUX, 🌿 I.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR BOURQUELOT

PHARMACIEN EN CHEF DE L'HÔPITAL LAENNEC

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

Hommage de respect et de reconnaissance.

A MONSIEUR QUEUILLE,

PHARMACIEN A NIORT.

Respectueuse reconnaissance.

A MA FAMILLE.

A MES AMIS.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INTRODUCTION

En 1911, MM. BOURQUELOT et BRIDEL ont constaté que la gentiopierine est hydrolysée par l'émulsine dans l'alcool éthylique même à 95° (1) et que cette hydrolyse se fait dans les alcools forts par simple contact, l'émulsine étant insoluble dans les alcools d'un titre égal ou supérieur à 60 °.

L'année suivante, ils ont montré, de même, que l'émulsine hydrolyse la salicine dans l'alcool éthylique (2) et la gentiopierine dans l'alcool méthylique (3), dans l'acétone, et dans l'éther acétique (4).

S'appuyant sur les résultats obtenus au cours de l'hydrolyse de la salicine par l'émulsine, les deux auteurs ont essayé de reproduire ce glucoside, en traitant ses composants (glucose et saligénine), en milieu alcoolique, par le même ferment (5).

(1) Em. BOURQUELOT et M. BRIDEL.— Action de l'émulsine sur la gentiopierine en milieu alcoolique (*Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), IV, p. 385, 1911).

(2) Em. BOURQUELOT et M. BRIDEL.— Action de l'émulsine sur la salicine en milieu alcoolique (*Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), V, p. 388, 1912).

(3) Em. BOURQUELOT et M. BRIDEL.— De l'action hydrolysante et de l'action synthétisante de l'émulsine dans l'alcool méthylique. Obtention du méthylglucoside β (*Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), VI, p. 53, 1912.)

(4) Em. BOURQUELOT et M. BRIDEL.— Action de l'émulsine sur la gentiopierine, en solution dans l'acétone et dans l'éther acétique (*Journ. de Pharm. et Chim.*, (7), V, p. 534, 1912).

(5) Em. BOURQUELOT et M. BRIDEL.— Sur une réaction synthétisante de l'émulsine (*Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), V, p. 569, 1912).

Ils n'ont pas obtenu de salicine, mais ils ont établi que, dans ce milieu, l'émulsine possédait des propriétés synthétisantes remarquables ; et se basant sur ces propriétés, ils ont donné une méthode générale de synthèse biochimique des glucosides d'alcools.

Disons de suite, que l'on a obtenu, il y a déjà une vingtaine d'années, par voie purement chimique, deux glucosides d'alcool : le méthylglucoside et l'éthylglucoside.

Le procédé général de préparation de ces deux glucosides, dû à E. FISCHER (1), consiste à traiter à froid du glucose par l'alcool saturé de gaz chlorhydrique ; ou, à 100°, du glucose par l'alcool renfermant 0 gr., 25 p. 100 de HCl.

Mais, par cette méthode, on obtient toujours un mélange de deux stéréoisomères : l'un, qu'on a appelé α , est dextrogyre, et hydrolysé par la glucosidase α (enzyme de la levure basse desséchée) ; l'autre β est lévogyre et hydrolysé par l'émulsine. L'avantage de l'action de l'émulsine est que l'on n'obtient qu'un seul stéréoisomère, le stéréoisomère β , qu'elle peut hydrolyser en solution aqueuse.

Grâce à cette méthode, MM. BOURQUELOT et BRIDEL ont obtenu, à l'état pur et cristallisé, 11 glucosides d'alcools :

Le méthylglucoside β (2) $\alpha_D = - 32^\circ, 50$.

L'éthylglucoside β (2) $\alpha_D = - 35^\circ, 80$.

Le propylglucoside β (2) $\alpha_D = - 38^\circ, 68$.

(1) *Über die Glucoside der Alkohole* (Ber. Chem. Gesells., XXVI, 2400, 1893).

(2) Em. BOURQUELOT et M. BRIDEL.— Synthèse de glucosides d'alcools à l'aide de l'émulsine : méthylglucoside β ; éthylglucoside β ; propylglucoside β (*Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), VII, p. 97, 1912).

Le butylglucoside β (1)	$\alpha_D = - 36^{\circ},54.$
L'isobutylglucoside β (1)	$\alpha_D = - 39^{\circ},18.$
L'allylglucoside β (1)	$\alpha_D = - 42^{\circ},18.$
L'isopropylglucoside β (2)	$\alpha_D = - 39^{\circ},10.$
L'isoamylglucoside β (2)	$\alpha_D = - 36^{\circ},40.$
Le benzylglucoside β (3)	$\alpha_D = - 53^{\circ},69.$
Le phényléthylglucoside β (4)	$\alpha_D = - 29^{\circ},80.$
Le cinnamylglucoside β (4)	$\alpha_D = - 46^{\circ},46.$

Ces glucosides sont tous hydrolysables par l'émulsine en solution aqueuse.

Par ce fait même, MM. BOURQUELOT et BRIDEL ont été amenés à revenir sur la question controversée de la réversibilité des actions fermentaires ; et il ressort de leurs travaux que l'émulsine agit synthétiquement ou hydrolytiquement suivant le milieu, par conséquent, que son action est réversible (5).

Le but de ce travail a été d'étudier en détail l'action synthétisante de l'émulsine sur le glucose en solution dans l'alcool méthylique. Mais, comme l'hydrolyse des

(1) Em. BOURQUELOT et M. BRIDEL.— Synthèse de glucosides d'alcools à l'aide de l'émulsine : butylglucoside β ; isobutylglucoside β ; allylglucoside β (*Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), VII, p. 193, 1912).

(2) Em. BOURQUELOT et M. BRIDEL. — Synthèse de glucosides d'alcools à l'aide de l'émulsine : isopropylglucoside β et isoamylglucoside β (*Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), VI, p. 442, 1912).

(3) Em. BOURQUELOT et M. BRIDEL.— Synthèse de glucosides d'alcools à l'aide de l'émulsine : benzylglucoside β (*Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), VI, p. 298, 1912).

(4) Em. BOURQUELOT et M. BRIDEL.— Synthèse de glucosides d'alcools à l'aide de l'émulsine : phényléthylglucoside β et cinnamylglucoside β (*Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), VII, p. 335, 1913).

(5) Em. BOURQUELOT et M. BRIDEL.— Synthèse de glucosides d'alcools à l'aide de l'émulsine.— La réversibilité des actions fermentaires (*Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), VI, p. 164, 1912).

glucosides en milieu méthylique n'avait pas encore été méthodiquement suivie, j'ai commencé par étudier l'hydrolyse de la salicine par l'émulsine dans l'alcool méthylique, ce qui fait l'objet d'un premier Chapitre. Le Chapitre II traite de l'action synthétisante de l'émulsine dans des alcools méthyliques de différents titres ; il se termine par une étude spéciale de la réversibilité de l'action de l'émulsine sur le méthylglucoside β en solution dans l'alcool méthylique.

Puis viennent successivement, l'étude de l'influence des variations des proportions d'émulsine (Chap. III).

L'étude de l'influence des variations de la température (Chapitre IV).

L'influence des variations des proportions de glucose (Chapitre V).

Dans le chapitre VI, sont exposées diverses expériences effectuées dans le but de savoir si certains composés (phénol ordinaire, acide chlorhydrique) ajoutés en proportions variables, ont une influence nocive ou favorisante sur la synthèse.

Le Chapitre VII, est consacré aux recherches concernant la synthèse biochimique du méthylglucoside β dans un liquide neutre étranger à la réaction (acétone).

Dans le Chapitre VIII, on trouvera les meilleures conditions à réaliser pour préparer le méthylglucoside β d'après les résultats fournis par les expériences précédentes. Enfin dans un dernier chapitre, se trouvent rassemblées les principales conclusions.

Afin de pouvoir comparer tous les résultats obtenus au cours de ce travail, on s'est toujours servi de matières premières identiques.

On a donc tout d'abord préparé du glucose pur (500 gr. environ), et de l'émulsine (100 gr. environ) en quantité suffisante pour toutes les expériences. Le glucose pur a été préparé en partant du glucose purifié du commerce, qu'on a fait recristalliser dans l'alcool à 95° bouillant (100 gr. de glucose pour 1000 cm³ d'alcool à 95°) son pouvoir rotatoire en solution aqueuse était : $\alpha_D = + 52^{\circ},06$.

$$(p = 1 \text{ gr.}, 7405 ; v = 25 ; l = 2 ; \alpha = + 7^{\circ}20')$$

On a déterminé également son pouvoir rotatoire dans des alcools méthyliques de différents titres et constaté qu'il augmente avec le titre de l'alcool.

C'est ainsi qu'on a trouvé les chiffres suivants pour le glucose en solution dans l'alcool méthylique à 30 p. 100 ; dans l'alcool méthylique à 60 p. 100 ; et dans l'alcool méthylique à 90 p. 100 :

1° Alcool méthylique à 30 p. 100 : $\alpha_D = + 55^{\circ},60$.

$$(p = 0 \text{ gr.}, 1978 ; v = 15 ; l = 2 ; \alpha = + 1^{\circ}28').$$

2° Alcool méthylique à 60 p. 100 : $\alpha_D = + 56^{\circ},86$.

$$(p = 0 \text{ gr.}, 2857 ; v = 15 ; l = 2 ; \alpha = + 2^{\circ}10').$$

3° Alcool méthylique à 90 p. 100 : $\alpha_D = + 58^{\circ},42$.

$$(p = 0 \text{ gr.}, 2054 ; v = 15 ; l = 2 ; \alpha = + 1^{\circ}36').$$

On a tenu compte de cette augmentation dans l'interprétation des changements optiques observés au cours des expériences.

Quant à l'émulsine, elle a été préparée avec des amandes douces, suivant le procédé indiqué par M. HÉRISSEY (1).

(1) Recherches sur l'émulsine.— *Thèse Doct. Univ.* (Pharmacie), Paris, 1899.

On a opéré sur 6 kilogrs d'amandes douces. L'émulsine obtenue a été finement pulvérisée, bien mélangée, et enfermée dans un flacon bien sec.

Pour effectuer les nombreux dosages de glucose que l'on a eu à faire au cours de ce travail, on a eu recours au procédé de M. G. BERTRAND (1), procédé dont le principe a été indiqué autrefois par MOHR (2), et qui n'est pas plus long que le procédé ordinaire à la liqueur de FEHLING.

L'alcool pouvant gêner dans la réaction, on s'en est débarrassé par évaporation, puis on a repris le résidu par de l'eau distillée de façon à effectuer le dosage en solution aqueuse.

C'est dans le laboratoire de M. le Professeur BOURQUELOT et sur ses indications, que j'ai entrepris ce travail.

Grâce aux conseils éclairés et aux encouragements de ce maître bienveillant, j'ai pu mener à bien la tâche qu'il m'avait confiée. Je suis heureux de pouvoir lui exprimer ici, l'expression de ma respectueuse reconnaissance.

Ma gratitude est également acquise à M. HÉRISSEY, Agrégé près l'Ecole supérieure de Pharmacie de Paris, dont les bons conseils ne m'ont jamais fait défaut.

Au préparateur du cours de Pharmacie Galénique, mon excellent camarade BRIDEL, qui m'a guidé dans mes travaux, avec une patience jamais lassée, et dont les précieux conseils, et les bienveillantes critiques, m'ont été du plus grand secours, j'adresse mes plus sincères remerciements.

(1) Le dosage des sucres réducteurs.— (*Bull. Soc. chim.*, (3), XXXV, XXXVI, p. 1287, 1906).

(2) *Zeit. f. analyt. Chim.*, XII, p. 296, 1873.

Je suis également très heureux de remercier ici d'une façon toute particulière, M. QUEVILLE, pharmacien à Niort, mon premier maître en pharmacie, qui, pendant les trois années de stage passées à ses côtés, et ensuite pendant tout le cours de mes études pharmaceutiques, n'a cessé de me prodiguer ses conseils et ses encouragements ; je le prie de croire toujours à ma profonde reconnaissance, et à mon entier dévouement.

CHAPITRE PREMIER.

Action de l'émulsine sur la salicine en solution dans des alcools méthyliques de différents titres.

Pour ces essais, on a commencé par purifier la salicine commerciale, en la faisant recristalliser dans de l'alcool à 95°. On a ainsi obtenu un produit dont le pouvoir rotatoire dans l'eau distillée était de : $\alpha_D = -65^{\circ},69$.

Comme cela se passe d'ailleurs avec l'alcool éthylique, le pouvoir rotatoire de la salicine dans l'alcool méthylique varie suivant la concentration de l'alcool.

C'est ainsi qu'on a trouvé à $+16^{\circ}$, pour le pouvoir rotatoire de la salicine en solution dans l'alcool méthylique à 30 p. 100, dans l'alcool méthylique à 60 p. 100, et dans l'alcool méthylique à 90 p. 100, les chiffres suivants :

1° Alcool méthylique à 30 p. 100 : $\alpha_D = -60^{\circ}$.

($p = 0$ gr.,1625 ; $v = 15$; $l = 2$; $\alpha = -1^{\circ}16'$).

2° Alcool méthylique à 60 p. 100 : $\alpha_D = -55^{\circ},58$.

($p = 0$ gr.,1709 ; $v = 15$; $l = 2$; $\alpha = -1^{\circ}16'$).

3° Alcool méthylique à 90 p. 100 : $\alpha_D = -53^{\circ},47$.

($p = 0$ gr.,1683 ; $v = 15$; $l = 2$; $\alpha = -1^{\circ}12'$).

Le pouvoir rotatoire de la salicine diminue donc à mesure que le titre alcoolique de la solution augmente.

On a fait dissoudre 1 gr. de salicine purifiée dans 100 cm³ d'alcool méthylique à 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 et 95 p. 100 en poids.

Après avoir pris la rotation de chacun des mélanges, on y a ajouté 0 gr.,20 d'émulsine, et on les a abandonnés à la température du laboratoire (+ 16° à + 19°); en les agitant de temps en temps.

On a examiné les liquides au polarimètre tous les quatre jours, et, à l'arrêt de la réaction, arrêt constaté par trois lectures égales, on a dosé le sucre réducteur existant.

Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau suivant :

TABLEAU N° I.

TITRE de l'alcool	ROTATION initiale (l=2)	ROTATION à l'arrêt (l=2)	DURÉE approximative de la réaction	SUCRE réducteur à l'arrêt
10 pour 100...	— 1°16'	+ 26'	8 à 15 jours	0 gr.508
20 — ...	— 1°14'	+ 20'	15 à 24 —	0 , 409
30 — ...	— 1°12'	+ 6'	15 à 24 —	0 , 309
40 — ...	— 1°10'	— 2'	15 à 24 —	0 , 248
50 — ...	— 1°8'	— 10'	15 à 24 —	0 , 199
60 — ...	— 1°6'	— 16'	15 à 24 —	0 , 139
70 — ...	— 1°6'	— 22'	15 à 24 —	0 , 097
80 — ...	— 1°6'	— 24'	24 à 31 —	0 , 063
90 — ...	— 1°4'	— 40'	24 à 31 —	0 , 020
95 — ...	— 1°4'	— 44'	38 à 45 —	0 , 011

Il ressort de tous ces chiffres, que la rotation finale et le sucre réducteur libéré sous l'action de l'émulsine, ont varié suivant la concentration de l'alcool.

Dans l'alcool à 95°, il n'y a eu qu'une hydrolyse très faible, la rotation gauche a diminué seulement de 20 minutes, et 0 gr.,011 de glucose ont été mis en liberté ; dans l'alcool à 50°, la rotation a baissé de 58 minutes, et il

s'est formé 0 gr.,199 de glucose ; mais il y a eu un recul de la rotation de 1°42', avec une mise en liberté de 0 gr.,508 de glucose dans l'alcool à 10 p. 100.

Done, moins il y avait d'alcool dans les mélanges, plus il s'est formé de sucre.

Une hydrolyse complète de la salicine aboutit à une rotation de + 39' ; or, dans aucun des cas ci-dessus, la salicine n'a subi le dédoublement total, à en juger du moins par les rotations finales ; mais on sait que le glucose, mis en liberté sous l'action de l'émulsine, se combine avec l'alcool, sous l'action du même ferment, pour former le méthylglucoside β . La rotation du liquide ne peut donc rendre un compte exact de l'état de la réaction, et il faut recourir au calcul, comme l'ont fait MM. BOURQUELOT et BRIDEL pour l'hydrolyse de la salicine dans l'alcool éthylique (1), pour savoir, si la réaction terminée, il reste encore de la salicine dans les mélanges et, par conséquent, si l'hydrolyse a été totale ou non.

Supposons que dans l'alcool à 60°, toute la salicine ait été hydrolysée : il a dû se former, pour un gramme de ce glucoside, et par 100 cm³, 0 gr.,629 de glucose ; or, comme la liqueur en contient 0 gr.,139, 0 gr.,490 de ce sucre se sont combinés à l'alcool pour former 0 gr.,527 de méthylglucoside β , de sorte que la liqueur devra présenter une rotation de :

$$\frac{0,139 \times 2 \times 56,8}{100} - \frac{0,527 \times 2 \times 32,5}{100} = -0^{\circ},185, \text{ c'est-à-dire } -11'.$$

On a trouvé — 16' dans l'expérience ; il se peut donc qu'il reste un peu de salicine non hydrolysée, ce qui expliquerait cette petite différence.

En calculant l'indice de réduction enzymolytique (poids

(1) Em. BOURQUELOT et M. BRIDEL. — De l'action synthétisante et de l'action hydrolysante de l'émulsine en milieu alcoolique (*Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), VI, p. 13, 1912).

en milligramme de sucre réducteur formé pour un changement de rotation de 1°, observé au tube de 2 décimètres dans 100 cm³ de liquide⁽¹⁾, on pourra encore avoir d'utiles indications sur la composition du mélange, l'indice devant être d'autant plus faible qu'il y a dans le liquide plus de méthylglucoside formé.

Le tableau suivant renferme les rotations calculées d'après le procédé indiqué plus haut, en supposant que toute la salicine est hydrolysée. On a reproduit les rotations observées, afin de les comparer plus facilement. En outre, on a joint les indices de réduction enzymolytique obtenus au cours de l'hydrolyse, et, dans une dernière colonne, les indices *théoriques*, en supposant qu'il ne se serait produit que l'hydrolyse.

TABLEAU N° II.

TITRE de l'alcool	ROTATION calculée	ROTATION observée	INDICE observé	INDICE théorique
10 pour 100...	+ 26'	+ 26'	324	337
20 — ...	+ 18'	+ 20'	285	340
30 — ...	+ 7'	+ 6'	257	342
40 — ...	0	— 2'	232	346
50 — ...	— 4'	— 10'	205	348
60 — ...	— 11'	— 16'	166	350
70 — ...	— 15'	— 22'	132	352
80 — ...	— 19'	— 24'	90	353
90 — ...	— 24'	— 40'	50	353
95 — ...	— 25'	— 44'	33	354

(1) Em. BOURQUELOT. — Nouvelle contribution à la méthode biochimique de recherche dans les végétaux des glucosides hydrolysables par l'émulsine : son application à l'étude des plantes employées en médecine populaire (*Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), II, p. 241, 1910).

En examinant ce tableau, on voit que, dans les premiers alcools, jusqu'à l'alcool à 40°, l'hydrolyse de la salicine a été totale, puisque la rotation observée est sensiblement la même que celle fournie par le calcul.

Dans les alcools à 50°, 60°, 70° et 80°, les différences entre les 2 rotations sont de 5 à 7', ce qui indique qu'il reste sans doute dans les liquides une légère proportion de salicine non hydrolysée.

Dans les alcools à 90° et à 95°, la différence est plus grande, 16' et 19' : il reste donc encore une quantité assez forte de salicine.

Les indices de réduction observés sont tous inférieurs aux indices théoriques, ce qui montre bien que, même dans les alcools faibles, il se forme une certaine quantité de méthylglucoside β .

Remarquons que les indices observés diminuent progressivement, au fur et à mesure que le titre alcoolique augmente.

En résumé, la salicine, comme la gentiopierine (1), est parfaitement hydrolysée par l'émulsine dans l'alcool méthylique.

Dans les alcools faibles, l'état d'équilibre dépend uniquement du méthylglucoside β formé et de ses composants (glucose et alcool), tandis que, dans les alcools forts, il existe deux états d'équilibre : l'un entre la salicine et ses composants, saligénine et glucose, et l'autre entre le méthylglucoside β et ses composants.

(1) *Loc. cit.*, p. 5.

CHAPITRE II.

Etude de l'action synthétisante de l'émulsine dans des alcools méthyliques de différents titres.

On a préparé des alcools méthyliques renfermant en poids, pour 100 parties de liquide : 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 parties d'alcool méthylique anhydre.

Avec chacun de ces différents alcools on a fait 500 cm³ de solution de glucose pur à 1 p. 100. Pour cela, on a dissous le sucre à l'ébullition dans une certaine quantité des liquides ; on a laissé refroidir, et on a ensuite complété le volume à 500 cm³. On a examiné la rotation ($l = 2$) des solutions ainsi préparées.

Comme on l'a fait remarquer plus haut, le pouvoir rotatoire du glucose n'est pas le même dans tous les alcools méthyliques ; il augmente à mesure que le titre alcoolique de la solution croît ; de ce fait, la rotation initiale de chacun des liquides a varié de quelques minutes, suivant la concentration alcoolique.

A 100 cm³ de chacune des solutions, on a ajouté 0 gr., 40 d'émulsine et on a abandonné les mélanges à la température du laboratoire (+ 16 à + 19°), en ayant soin de les agiter de temps en temps.

On a observé les changements optiques d'abord tous les quatre jours, puis tous les huit jours, jusqu'à l'arrêt de la réaction, arrêt constaté par trois rotations égales prises à 4 jours d'intervalle.

A ce moment, on a dosé le sucre réducteur restant ;

pour cela, on a prélevé une certaine quantité de liquide, on a évaporé l'alcool qui pouvait gêner dans le dosage, on a dissous l'extrait dans 20 cm³ d'eau distillée, et on a continué l'opération par la méthode indiquée plus haut.

Comme l'émulsine se dissout dans les alcools faibles, et détermine par cela même, une légère rotation gauche, dont on a dû tenir compte dans l'interprétation des résultats, on a préparé avec chacun des alcools les mélanges suivants :

Alcool méthylique.....	25 cm ³
Emulsine	0 gr.,10

On a observé la rotation de ces liquides au bout de 8 jours ; et on a ajouté ou retranché cette rotation de celle qu'on a obtenue à l'arrêt de la réaction, dans les essais de synthèse.

Dans le tableau ci-dessous sont rassemblés les résultats obtenus ; on y a inscrit seulement la rotation après l'arrêt de la réaction, la quantité de glucose restant dans chaque alcool et la durée approximative de la réaction.

TABLEAU N° III.

TITRE de l'alcool	DURÉE APPROXIMATIVE de la réaction	ROTATION A L'ARRÊT de la réaction	SUCRE RÉDUCTEUR à l'arrêt
10 pour 100.....	1 à 4 jours	+ 42'	0 gr.792
20 —	4 à 8 —	+ 26'	0 , 638
30 —	8 à 12 —	+ 10'	0 , 504
40 —	12 à 16 —	— 2'	0 , 392
50 —	20 à 24 —	— 10'	0 , 311
60 —	24 à 28 —	— 16'	0 , 243
70 —	28 à 32 —	— 24'	0 , 174
80 —	36 à 40 —	— 32'	0 , 117
90 —	2 mois environ	— 40"	0., 062
95 —	plus de 4 mois	— 42'	0 , 046

De même que l'ont observé précédemment MM. BOURQUELOT et BRIDEL, avec l'alcool méthylique à 85° (1), il ressort tout d'abord de ces résultats que sous l'influence de l'émulsine, dans tous les alcools méthyliques, une certaine quantité du glucose a disparu; il s'est donc fait une synthèse. Mais, comme cela se passe pour l'alcool éthylique (2), cette synthèse atteint un certain équilibre qui varie suivant la concentration de l'alcool.

C'est dans l'alcool à 95° qu'il s'est fait le plus de glucoside; la réaction s'y est poursuivie très lentement; presque nulle dans les 8 premiers jours, puis plus rapide, pour se ralentir à nouveau et s'arrêter finalement après plus de 4 mois, lorsque 95,4 de glucose pour 100, étaient transformés en méthylglucoside β .

Dans l'alcool à 90°, la réaction a été lente au début; néanmoins, l'équilibre a été atteint en 2 mois environ, alors que 93,8 pour 100 de sucre étaient transformés en glucoside. Dans l'alcool à 50°, l'action a été beaucoup plus rapide et 0 gr.,689 de glucose sont encore passés à l'état de méthylglucoside. Enfin, dans l'alcool à 10 p. 100, la synthèse s'est arrêtée au bout de 4 jours, mais il n'y a eu que 0 gr.,208 de glucose transformés en glucoside.

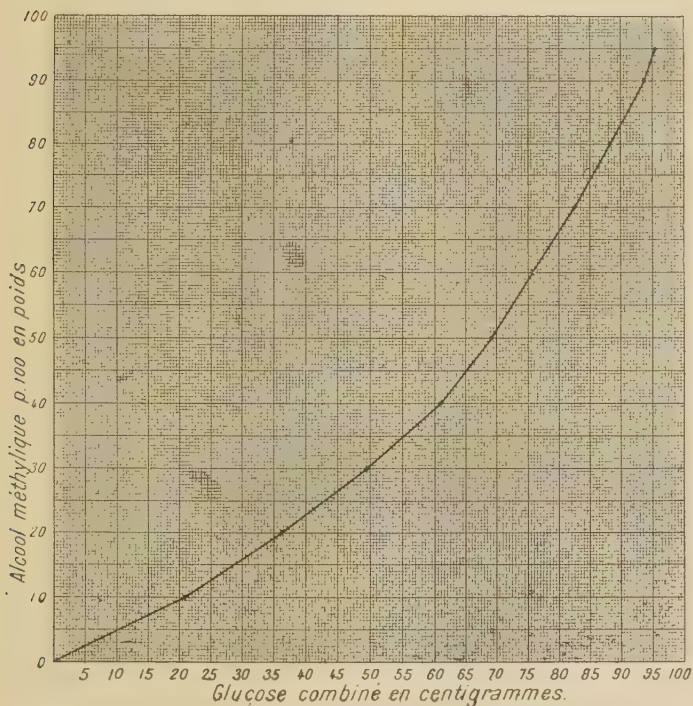
Ces essais ont également montré que c'est dans les liquides où il y a le plus d'alcool que la réaction a duré le plus longtemps. Il a fallu plus de 4 mois pour arriver à la limite dans l'alcool à 95°; 2 mois dans l'alcool à 90°, 36 à 40 jours dans l'alcool à 80°, 24 à 28 jours dans l'alcool à 60°, 12 à 16 jours dans l'alcool à 40°, tandis que, dans l'alcool à 10 p. 100, on a atteint l'équilibre dans les 4 premiers jours.

(1) Em. BOURQUELOT et M. BRIDEL. — De l'action hydrolysante et synthétisante de l'émulsine dans l'alcool méthylique (*Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), VI, p. 60, 1912).

(2) Em. BOURQUELOT et M. BRIDEL. — Synthèse de glucosides d'alcools à l'aide de l'émulsine. — La réversibilité des actions fermentaires (*Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), VI, p. 164, 1912).

Ainsi dans les différents alcools méthyliques mis en expérience, avec 1 gramme pour 100 de glucose pur, et 0 gr., 40 d'émulsine, on a constaté qu'il s'est fait une synthèse, d'autant plus forte, qu'il y avait plus d'alcool.

Si maintenant, on examine les résultats dans leur ensemble, on voit très nettement que les proportions de glucose non combiné vont en diminuant à mesure que le titre alcoolique s'élève ; c'est ce qu'on a pu représenter par la courbe (1) ci-dessous qui figure la loi de croissance du glucose combiné dans les alcools de titre de plus en plus élevé.



(1) Em. BOURQUELOT et Em. VERDON. — La réversibilité des actions fermentaires : émulsine et méthylglucoside β (*Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), VI, p. 377, 1913, et *Comptes Rendus, Académie des Sciences*, T. CLVI, p. 957, 1913).

Elle a été tracée en prenant comme abscisses les quantités de glucose combiné, et comme ordonnées les titres en centième des alcools méthyliques, dans lesquels a eu lieu la combinaison.

Elle part du point zéro représentatif de l'eau pure tenant en solution 1 gramme de glucose pour 100 ; elle s'élève d'abord lentement, puis plus rapidement jusqu'à devenir parallèle à la ligne des ordonnées, un peu avant d'atteindre la verticale qui correspond à la combinaison totale du glucose, ce qui s'accorde avec le fait qu'il ne se produit pas de synthèse dans l'alcool pur.

Cette courbe est la courbe des synthèses.

On devait penser, d'après ce que MM. BOURQUELOT et BRIDEL ont démontré pour l'éthylglucoside β et le glucose, qu'on aurait abouti aux mêmes équilibres, si, au lieu de partir de 1 gramme de glucose, on était parti de la quantité correspondante de méthylglucoside β . On n'a pas effectué cette démonstration pour tous les alcools, mais pour deux seulement : l'alcool méthylique à 40° et l'alcool à 80°. On a d'ailleurs calqué cette expérience sur celle de MM. BOURQUELOT et BRIDEL avec l'éthylglucoside β et le glucose dans l'alcool éthylique à 40° et à 80°.

A₁. — Hydrolyse.

Méthylglucoside β .. 0 gr.,5440
Alcool méthylique à
40 p. 100.. Q. S. p. 50 cm³

A₂. — Synthèse.

Glucose pur 0 gr.,5047
Alcool méthylique à
40 p. 100.. Q. S. p. 50 cm³

B₁. — Hydrolyse.

Méthylglucoside β .. 0 gr.,5397
Alcool méthylique à
80 p. 100.. Q. S. p. 50 cm³

B₂. — Synthèse.

Glucose pur 0 gr.,5007
Alcool méthylique à
80 p. 100.. Q. S. p. 50 cm³

Les proportions de glucose libre de A₂ et de B₂ sont, comme on le voit, respectivement égales à celles du glucose combiné qui entrent dans la composition du méthylglucoside de A₁ et de B₁.

On a pris les rotations après avoir attendu que le pouvoir rotatoire du glucose fût devenu stable, puis on a ajouté à chacune des solutions 0 gr.,30 d'émulsine, et on les a abandonnées à la température du laboratoire (+16° à +19°), en ayant soin d'agiter de temps en temps. On a suivi les réactions au polarimètre jusqu'à l'arrêt.

Dans le tableau ci-dessous sont rassemblés les résultats de ces essais.

TABLEAU N° IV.

	ROTATION initiale (l=2)	ROTATION à l'arrêt	SUCRE RÉDUCTEUR à l'arrêt	DURÉE de la réaction
A ₁	— 42'	— 6'	0 gr 194	8 à 12 jours
A ₂	+ 64'	— 6'	0 , 194	12 à 16 —
B ₁	— 46'	— 34'	0 , 0535	4 à 8 —
B ₂	+ 70' (1)	— 34'	0 , 0545	20 à 24 —

(1) Les différences de rotation initiale entre A₂ et B₂, s'expliquent par ce fait que le pouvoir rotatoire du glucose en solution dans l'alcool méthylique, s'élève avec le titre de l'alcool (V page 5).

Ainsi, de même que dans les expériences effectuées avec l'alcool éthylique, si, pour des alcools méthyliques de même titre, on emploie des quantités correspondantes de méthylglucoside β et de glucose, l'hydrolyse et la synthèse atteignent le même état d'équilibre.

Cet état d'équilibre variable pour les différents titres alcooliques, est fixe d'une expérience à l'autre lorsque la composition du milieu reste la même.

En sera-t-il encore ainsi, si, sans changer les composants, on fait varier la quantité de ferment; en d'autres

termes, cet état d'équilibre est-il indépendant de la quantité d'émulsine mise en œuvre ?

C'est cette étude qui va faire l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE III.

Variations des proportions d'émulsine.

On vient de voir que l'état d'équilibre entre le glucose restant en solution et le glucoside formé variait avec le titre alcoolique de la liqueur, et que l'on arrivait au même point, que l'on parte du glucose, ou de la quantité correspondante de méthylglucoside β .

Dans ce chapitre, on a étudié quelle pouvait bien être l'influence de la proportion du ferment sur la marche de la réaction, et sur le point d'équilibre final.

Pour cela, on a opéré sur des alcools méthyliques de différents titres (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 p. 100 en poids), renfermant en solution 1 gramme de glucose pur et anhydre pour 100 cm³.

Avec chacune de ces solutions, on a fait trois essais, dans lesquels, la quantité de solution étant de 100 cm³, on a employé 0 gr., 20, 0 gr., 40 et 0 gr., 60 d'émulsine. En tout, par conséquent 30 essais, que l'on a abandonnés à la température du laboratoire (+ 16 à + 20°), en agitant de temps en temps. La rotation de ces liquides a été prise tous les quatre jours jusqu'à l'arrêt de la réaction, arrêt constaté par l'égalité de trois rotations observées successivement.

Le sucre réducteur n'a été dosé qu'après l'arrêt de la réaction.

Dans le tableau suivant, sont groupés les résultats de ces essais.

TABLEAU N° V.

TITRE de l'alcool	EMULSINE : 0 gr., 20		EMULSINE : 0 gr., 40		EMULSINE : 0 gr., 60	
	Rotation finale	Sucre réducteur à l'arrêt	Rotation finale	Sucre réducteur à l'arrêt	Rotation finale	Sucre réducteur à l'arrêt
10 p. 100...	+ 42'	0 gr. 803	+ 42'	0 gr. 792	+ 42'	0 gr. 839
20 — ...	+ 28'	0, 634	+ 26'	0, 638	+ 26'	0, 638
30 — ...	+ 14'	0, 504	+ 10'	0, 504	+ 10'	0, 517
40 — ...	— 4'	0, 401	— 2'	0, 392	— 2'	0, 394
50 — ...	— 8'	0, 319	— 10'	0, 311	— 10'	0, 311
60 — ...	— 16'	0, 248	— 16'	0, 243	— 16'	0, 241
70 — ...	— 24'	0, 174	— 24'	0, 174	— 22'	0, 174
80 — ...	— 32'	0, 120	— 32'	0, 117	— 32'	0, 120
90 — ...	— 40'	0, 062	— 40'	0, 062	— 40'	0, 061
95 — ...	— 42'	0, 050	— 42'	0, 046	— 42'	0, 045

Ce qui ressort tout d'abord de ces résultats, c'est que, la proportion d'émulsine, a été sans influence sur la limite de l'action fermentaire. Si l'on envisage, par exemple, les essais effectués dans l'alcool à 50 p. 100, on voit que les trois solutions, au moment où s'est arrêtée la réaction, accusaient sensiblement la même rotation (— 10') et renfermaient la même quantité de glucose non combiné, 0 gr., 311 ; dans l'alcool à 70 p. 100, l'action s'est arrêtée dans les trois cas à — 24' et les trois solutions renfermaient 0 gr., 174 de sucre réducteur.

Mais si l'augmentation de la quantité d'émulsine est sans influence sur l'équilibre final, elle accroît cependant la vitesse de la réaction, de telle sorte que celle-ci s'effec-

tue dans un temps d'autant plus court que la proportion de ferment est plus forte.

Dans les conditions où l'on a expérimenté, les observations polarimétriques se faisant à de longs intervalles, la valeur de cette augmentation de vitesse est surtout apparue dans les alcools forts, la réaction durant plus longtemps.

Ainsi dans l'alcool à 80°, l'équilibre a été atteint en moins d'un mois avec 0 gr.,60 d'émulsine ; en 36 à 40 jours, avec 0 gr.,40, et en 3 mois environ avec 0 gr.,20. Dans l'alcool à 95°, il a fallu deux mois environ avec 0 gr.,60 d'émulsine, et 4 mois environ avec 0 gr.,40.

En ce qui concerne l'essai effectué avec 0 gr.,20, la réaction s'est arrêtée vers le cinquième mois, bien que l'équilibre indiqué par les deux autres essais n'ait pas été encore atteint.

Les expériences suivantes ont montré que ce long contact avec l'alcool méthylique à 95° avait détruit l'activité de la petite quantité d'émulsine de cet essai.

On a recueilli les 20 centigrammes d'émulsine ayant, pendant 5 mois, agi dans la solution de glucose, dans l'alcool à 95° ; on l'a lavée à l'alcool, puis on l'a fait sécher. On a essayé son activité au point de vue synthétisant et au point de vue hydrolysant.

Pour l'essayer synthétiquement, on en a ajouté 0 gr.,05 à 25 cm³ d'une solution à 1 p. 100 de glucose dans l'alcool méthylique à 30°. En 20 jours, à la température ordinaire, la rotation de la solution a passé de + 1° 6' à + 1°, ce qui indique une réaction très faible, l'émulsine neuve produisant dans le même temps une diminution de rotation de 46'.

On a fait agir ensuite cette émulsine, d'une part, sur une solution aqueuse à 1 p. 100 de méthylglucoside β , et d'autre part, sur une solution aqueuse à 1 p. 100 de salicine.

Il n'y a pas eu hydrolyse du méthylglucoside β , tandis que la salicine a encore été partiellement hydrolysée. C'est ainsi que la rotation ($-1^{\circ}16'$) a passé en 8 heures à $-44'$ et en 24 heures à 0. L'hydrolyse est donc très nette, et cette différence d'action sur 2 glucosides également dédoublables par l'émulsine méritait d'être signalée.

Quoiqu'il en soit, on peut considérer pour le cas qui nous occupe, que l'émulsine maintenue pendant 5 mois dans une solution de glucose dans l'alcool à 95° , a perdu ses propriétés fermentaires.

Dans ces conditions, on a ajouté à la solution 0 gr.,20 d'émulsine neuve, ce qui a permis d'arriver enfin à l'état d'équilibre des 2 autres essais : $\alpha = -42'$.

Comme on vient de démontrer que l'émulsine s'affaiblit fortement quand on l'a fait agir sur le glucose en solution dans l'alcool à 95° , on a voulu voir si cet affaiblissement provenait du fait qu'elle agit dans l'alcool, ou simplement de l'action nocive de l'alcool.

En conséquence, on a mis dans 3 flacons, 0 gr.,25 d'émulsine en contact avec 50 cm^3 d'alcool méthylique à 95° .

On a essayé cette émulsine sur une solution aqueuse de salicine, en la recueillant : celle du premier flacon au bout d'un mois, celle du deuxième au bout de 2 mois, celle du 3^e au bout de 3 mois. On essayait en même temps une émulsine qu'on avait conservée dans un flacon sec.

Après un séjour d'un mois dans l'alcool à 95° , l'émulsine a perdu une partie de son activité. Ainsi en 12 heures, on a observé un retour à droite de la rotation de $1^{\circ}12'$, tandis que dans un essai fait avec l'émulsine témoin, le retour a été de $1^{\circ}42'$.

Après un séjour de 2 mois et 3 mois dans l'alcool à 95° , on a constaté une diminution plus grande encore de l'activité : en 12 heures, il y a eu dans les 2 cas un retour de $22'$ seulement.

En résumé, la quantité d'émulsine n'agit pas sur l'équilibre de la réaction, mais seulement sur la vitesse. La réaction se fait d'autant plus vite qu'il y a plus de ferment.

Cette différence de vitesse, est manifeste surtout dans les alcools forts qui ont une action nocive sur l'émulsine qui reste un certain temps à leur contact.

CHAPITRE IV.

Variations de la température

Les essais de synthèse effectués jusqu'ici, ont tous été faits à la température de $+ 16$ à $+ 19^{\circ}$. Pour déterminer exactement dans quelles conditions s'effectue le mieux le travail synthétique, il était naturel d'essayer l'action de l'émulsine dans les différents alcools méthyliques à des températures variées.

Les expériences ont été faites à $+ 9^{\circ}$, $+ 30^{\circ}$, $+ 40^{\circ}$ et $+ 50^{\circ}$. Les mélanges ont été préparés de la même façon que précédemment, c'est-à-dire qu'on a employé des alcools méthyliques à 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 pour 100 en poids, contenant chacun, pour 100 cm^3 , 1 gramme de glucose pur et 0 gr., 20 d'émulsine.

Pour la suite des opérations, on a suivi la marche déjà décrite.

Dans le tableau ci-dessous, sont exprimés les divers résultats obtenus aux températures de $+ 9^{\circ}$ et $+ 30^{\circ}$; on y a joint ceux qui ont été obtenus à $+ 16$ et $+ 19^{\circ}$ avec la même quantité d'émulsine.

Quant aux essais à $+ 40^{\circ}$ et $+ 50^{\circ}$, étant donné qu'à ces températures, l'émulsine est détruite sinon complètement, du moins partiellement, dans l'alcool méthylique; il suffira de donner quelques chiffres pour montrer qu'il ne s'est point fait de synthèse.

TABLEAU N° VI.

TITRE de l'alcool	TEMPÉRATURE de + 9°		TEMPÉRATURE de + 16°, + 19°		TEMPÉRATURE de + 30°	
	Rotation à l'arrêt	Sucre réducteur à l'arrêt	Rotation à l'arrêt	Sucre réducteur à l'arrêt	Rotation à l'arrêt	Sucre réducteur à l'arrêt
10 p. 100...	+ 42'	0 gr 792	+ 42'	0 gr 803	+ 44'	0 gr.807
20 — ...	+ 28'	0, 632	+ 20'	0, 634	+ 32'	0, 645
30 — ...	+ 10'	0, 466	+ 14'	0, 504	+ 16'	0, 527
40 — ...	— 6'	0, 378	— 4'	0, 401	+ 4'	0, 433
50 — ...	— 14'	0, 281	— 8'	0, 319	— 6'	0, 365
60 — ...	— 22'	0, 216	— 16'	0, 248	— 6'	0, 265
70 — ...	— 26'	0, 172	— 24'	0, 174	+ 2'	0, 413
80 — ...	— 32'	0, 120	— 32'	0, 120	+ 20'	0, 555
90 — ...	— 40'	0, 062	— 40'	0, 062	+ 30'	0, 660
95 — ...	— 38'	0, 063	— 42'	0, 050	+ 46'	0, 762

A la température de + 9° et de + 16° à + 19°, les résultats sont à peu près semblables, il y a seulement des différences de vitesse. Dans l'alcool à 10°, par exemple, la réaction s'est arrêtée dans les deux cas à + 42', et il s'est combiné 0 gr.,208 de glucose, à + 9°, et 0 gr.,197 à + 16° à + 19° ; mais il a fallu 14 à 27 jours à la température de + 9° pour atteindre l'équilibre, tandis qu'on y est arrivé au bout de 8 à 12 jours à + 16° + 19°. Dans l'alcool à 40° à la température de + 9°, la réaction s'est arrêtée au bout de deux mois environ à -6' ; dans le même alcool à la température de + 16° à + 19° cette limite a été atteinte dans 20 à 24 jours ; dans un cas (9°), 0 gr.,622 de glucose ont été combiné à l'alcool, dans l'autre (+ 16° + 19°) 0 gr.,599. Dans l'alcool à 80° on a constaté la même différence dans la vitesse de la réaction ; la limite a été atteinte en trois mois environ à la température de + 16° + 19° ; il a fallu

attendre quatre mois pour obtenir la même rotation à la température de $+ 9^{\circ}$.

Ainsi, qu'on effectue la synthèse à la température de $+ 9^{\circ}$ ou à la température de $+ 16^{\circ}$ à $+ 19^{\circ}$, les résultats obtenus sont les mêmes ; seule la vitesse de la réaction change.

Si on considère maintenant les résultats à la température de $+ 30^{\circ}$, on y trouvera des différences assez marquées, non seulement dans la vitesse de la réaction, mais encore dans les rotations finales et dans la proportion de sucre réducteur existant à l'arrêt de la réaction ; et ces différences sont plus accentuées dans les alcools forts que dans les alcools faibles. Dans l'alcool à 10 p. 100, on a combiné à $+ 9^{\circ}$, 0 gr.,208 de glucose, à $+ 16$ à $+ 19^{\circ}$ 0 gr.,197, et à $+ 30^{\circ}$, 0 gr.,193 ; dans l'alcool à 20^c à l'arrêt de la réaction, il restait encore 0 gr.,632 de sucre non combiné à $+ 9^{\circ}$; 0 gr.,634 à $+ 16^{\circ}$ à $+ 19^{\circ}$; et 0 gr.,645 à $+ 30^{\circ}$.

Mais, dans l'alcool à 70^c, et dans les alcools supérieurs, les différences sont plus grandes ; on n'a combiné en 2 mois dans l'alcool à 95^c que 0 gr.,238 de glucose ; alors que dans le même alcool à la température de $+ 16$ à $+ 19^{\circ}$ on en a combiné 0 gr.,950. Après de tels résultats à la température de $+ 30^{\circ}$, il était à prévoir qu'à des températures plus élevées, l'émulsine serait complètement détruite et qu'il ne se ferait plus du tout de synthèse.

On a constaté en effet, après avoir maintenu les mélanges pendant quatre jours à l'étuve à $+ 40^{\circ}$ et à $+ 50^{\circ}$, que s'il y avait encore une synthèse partielle dans les alcools à 20 et à 30 p. 100, il n'y avait pour ainsi dire pas d'action dans les alcools plus forts. On a dosé le sucre restant dans ces alcools à l'arrêt de la réaction, et on a trouvé que dans l'alcool à 10^c à $+ 40^{\circ}$, on avait combiné 0 gr.,149 de glucose ; 0 gr.,138 dans l'alcool à 30^c, et seulement 0 gr.,026 dans l'alcool à 60 p. 100. Il n'y a donc eu à cette température, qu'une très légère action de l'émulsine.

Quant aux essais effectués à la température de $+ 50^{\circ}$ c'est à peine si on y a constaté un recul de la rotation vers la gauche dans l'alcool le moins concentré. A cette température, l'émulsine paraît être rapidement détruite.

Pour s'en assurer, on l'a recueillie, on l'a lavée avec un peu d'alcool à 95° , puis on l'a séchée et on a essayé son action hydrolysante sur une solution de salicine à 1 p. 100. Il n'y a pas eu hydrolyse de la salicine, ce qui indique bien la destruction du ferment.

Pour expliquer d'une façon plus précise l'action de la température sur l'émulsine dans l'alcool méthylique, on a fait un essai pour tous les alcools méthyliques à des températures variant depuis 30° , jusqu'à $+ 70^{\circ}$. En somme, on a répété dans l'alcool méthylique, les essais que MM. BOURQUELOT et BRIDEL avaient effectués avec l'alcool éthylique (1).

On a fait d'une part, une macération d'émulsine à 2 p. 100 dans l'eau distillée toluénée, on a laissé le ferment en contact pendant deux jours en agitant de temps en temps; après quoi on a filtré, de façon à avoir une solution limpide.

On a préparé les différents alcools, avec la macération d'émulsine qui remplaçait une quantité correspondante d'eau distillée, comme l'indique le tableau suivant.

Pour les alcools à 90 et 95 p. 100, on a employé un macéré d'émulsine à 8 p. 100, préparé dans les mêmes conditions.

(1) Em. BOURQUELOT et M. BRIDEL. — Sur la température de destruction de l'émulsine, dans des alcools éthyliques de différents titres (*Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), VII, p. 27, 1913).

TABLEAU N° VII.

DEGRÉ de l'alcool	ALCOOL méthylique pur	SOLUTION d'émulsine à 2 %	SOLUTION d'émulsine à 8 %	EAU distillé	Alcool au titre: Quantité suffisante pour 100 ^{cm3}
	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	
10 pour 100.....	12,6	10		77,5	
20 —	24,76	10		66,19	
30 —	34,4	10		55,4	
40 —	48,1	10		45,04	
50 —	57,6	10		35,04	
60 —	66,6	10		25,08	
70 —	76,06	10		15,6	
80 —	85	10		6,6	
90 —	92,7		2,5	5,56	
95 —	98,01		2,5	1,4	

Chaque liquide correspond donc pour 100 cm³, à 0 gr., 20 d'émulsine.

Les mélanges ont été faits de la façon suivante: dans un ballon gradué de 100 cm³, on a placé 10 cm³ de solution d'émulsine, puis l'eau distillée; on a bien mélangé les deux liquides et on a ajouté en dernier lieu l'alcool méthylique. Ainsi l'émulsine ne s'est jamais trouvée en présence d'un liquide de titre alcoolique supérieur à celui qu'on voulait obtenir.

On a fait 100 cm³ de chaque mélange qu'on a répartis dans 10 tubes à essais numérotés de 1 à 10; le n° 1 a été mis de côté pour servir de témoin, les autres tubes ont été fermés avec des bouchons de liège et placés dans un panier en fer plongeant dans une casserole pleine d'eau, laquelle se trouvait elle-même dans l'eau d'un bain-marie.

A côté de ces 10 tubes on en a placé un onzième contenant également 10 cm³ d'eau et un thermomètre. On a chauffé le bain-marie graduellement pour que la tempéra-

ture du thermomètre s'élève régulièrement de 1° toutes les deux minutes. Le thermomètre marquait + 20° lorsqu'on a commencé l'opération ; on a retiré le n° 2 à + 30° ; le 3 à + 35° ; le 4 à + 40° ; le 5 à + 45° ; le 6 à + 50° ; le 7 à + 55° ; le 8 à + 60° ; le 9 à + 65° et le n° 10 à + 70°. On a laissé refroidir les liquides, puis dans chacun des tubes on a ajouté 10 cm³ d'une solution de salicine à 2 p. 100. Après 12 heures pour les trois premiers alcools, 24 heures pour l'alcool à 40 et 50 p. 100, 48 heures pour l'alcool à 60 et 70 p. 100 et 4 jours pour les autres, on a examiné le contenu des tubes au polarimètre.

Dans l'alcool à 10 p. 100 jusqu'à la température de + 55° comprise, la rotation du liquide et celle du témoin, étaient identiques ; à 60°, la déviation n'était plus que de + 10', à 65° de — 25' et à 70° de — 1°16', c'est-à-dire qu'à cette température, il ne s'était pas fait d'hydrolyse.

Dans l'alcool à 10 p. 100, l'émulsine a commencé à perdre son action hydrolysante entre + 55° et + 60° pour être complètement détruite avant d'atteindre + 70°.

Les résultats obtenus avec les autres alcools sont réunis dans le tableau ci-dessous.

TABLEAU N° VIII.

TITRE ALCOOLIQUE	DIMINUTION DE L'ACTIVITÉ	DESTRUCTION TOTALE
10 pour 100.....	Entre + 55°-60°	Entre + 65°-70°
20 —	— 50°-55°	— 60°-65°
30 —	— 45°-50°	— 60°-65°
40 —	— 40°-45°	— 55°-60°
50 —	— 40°-45°	— 55°-60°
60 —	— 40°-45°	— 55°-60°
70 —	— 40°-45°	— 55°-60°
80 —	— 35°-40°	— 55°-60°
90 —	— 35°-40°	— 60°-65°
95 —	30°	— 60°-65°

Ainsi, de même que pour l'alcool éthylique, dans tous les alcools méthyliques faibles (jusque vers 50°), l'émulsine a perdu de son activité à des températures d'autant plus basses que l'alcool est plus concentré ; dans les alcools forts où l'émulsine est précipitée, sa résistance à l'action destructrice de la chaleur, paraît être plus forte.

Ces essais n'expliquent pas pourquoi l'émulsine n'agit que pendant un temps relativement court à la température de + 30°, puisque la diminution de son activité, sauf dans l'alcool à 95°, n'a commencé qu'à une température supérieure.

Comme on n'avait maintenu les tubes que pendant 2 minutes à chaque température, on a pensé que le facteur temps était à envisager, et qu'un séjour prolongé à + 30°, ferait peut-être apparaître déjà un commencement de diminution d'activité.

En conséquence, on a répété les mêmes essais que plus haut dans les alcools à 10, 40, 70 et 90 pour 100, et on a maintenu les tubes à + 30° pendant 2 jours. Au bout de ce temps, on a ajouté une solution aqueuse de salicine.

Dans les alcools à 10 et 40°, le séjour à l'étuve à + 30° a été sans action, l'hydrolyse s'étant effectuée comme dans le témoin.

Dans l'alcool à 70°, il y a eu déjà diminution de l'activité : il y a un retour plus fort de 14' dans le témoin. Dans l'alcool à 90°, la différence est encore plus accentuée et on peut dire qu'en 2 jours, les 2 tiers de l'émulsine sont déjà détruits.

On comprend donc maintenant pourquoi l'émulsine n'agit que peu de temps à + 30° : son action diminue assez rapidement à cette température dans les alcools forts.

Dans la première série d'essais qu'on a faits à + 30°, on a employé 0 gr., 20 d'émulsine ; on a voulu voir, si en utilisant une proportion double de ferment, on arriverait au point d'équilibre.

On y arrive très facilement dans les alcools faibles : c'est ainsi que dans l'alcool à 20° la réaction s'est arrêtée alors que la rotation était à $+ 26'$, comme à la température ordinaire.

Dans les alcools forts, on va plus loin qu'avec 0 gr.,20 d'émulsine, ce qui se conçoit très facilement, mais on n'atteint pas le point d'équilibre. Dans l'alcool à 70°, on ne peut dépasser $- 12'$ et il reste encore 0 gr.,286 de glucose, alors que le point d'équilibre est à $- 24'$ et qu'il y reste 0 gr.,174 de glucose.

En résumé, à la température de $+ 9^\circ$, les résultats obtenus sont sensiblement les mêmes qu'à la température de $+ 16$ à $+ 19^\circ$, mais la réaction se fait plus lentement qu'à cette température.

A $+ 30^\circ$, l'émulsine est peu à peu détruite, surtout dans les alcools forts, ce qui explique pourquoi on ne peut atteindre le point d'équilibre même avec des proportions doubles de ferment.

A $+ 40^\circ$ et $+ 50^\circ$, elle est rapidement détruite, et il n'y a pour ainsi dire pas d'action.

C'est donc à la température ordinaire $+ 16$ à $+ 19^\circ$ que l'action synthétisante de l'émulsine s'exerce le mieux dans l'alcool méthylique.

On vient de voir que jusqu'ici, ni la température, ni la quantité de ferment, ne font varier l'équilibre de la réaction. Seule la proportion d'alcool, l'un des composants du glucoside a une influence sur cet état d'équilibre. Voyons maintenant ce qu'il en est pour l'autre composant, le glucose.

CHAPITRE V.

Variations des proportions de glucose. — Influence des produits de la réaction sur l'arrêt de celle-ci ⁽¹⁾.

Les facteurs que l'on peut faire varier dans la synthèse biochimique du méthylglucoside β sont : la proportion d'émulsine, la température, le titre de l'alcool méthylique, et la proportion de glucose.

On a vu que l'état d'équilibre auquel aboutit la réaction est indépendant de la quantité d'émulsine ajoutée (voir page 22), ainsi que la température à laquelle on opère, à la condition que cette température soit inférieure à celle où commence la destruction du ferment (voir page 27). Que l'on augmente la proportion d'émulsine ou qu'on élève la température, on obtiendra donc, si le titre alcoolique et la teneur en glucose restent fixes, la même quantité de glucoside.

On a vu, par contre, que, la quantité de glucose restant fixe, la proportion de celui qui se combine croît avec le titre alcoolique jusqu'à atteindre, dans de l'alcool méthylique à 95 p. 100 en poids, tenant en solution 1 p. 100 de glucose, plus des 95 centièmes du sucre (voir page 15).

Restait à rechercher si, et dans quelle mesure, l'emploi

(1) Em. BOURQUELOT, Em. VERDON. — De l'emploi des proportions croissantes de glucose dans la synthèse biochimique du méthylglucoside β . Influence des produits de la réaction sur l'arrêt de celle-ci (*Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), VII, p. 575, 1913).

de proportions variées de glucose influerait sur l'état d'équilibre final.

Ces recherches ont été faites avec de l'alcool méthylique à 70 p. 100 en poids.

Cet alcool peut dissoudre plus de 30 p. 100 de glucose. On n'a pas employé d'alcools plus concentrés, bien qu'avec ceux-ci la synthèse aille plus loin, parce que ces alcools dissolvent moins de glucose et que l'expérience aurait duré beaucoup trop longtemps.

¶ On a préparé des solutions méthyliques glucosées renfermant, pour 100 cm³, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 et 30 grammes de glucose. Pour cela, on a dissous chaque poids de sucre à l'ébullition dans 60 à 75 cm³ d'alcool à 70°, on a laissé refroidir et complété le volume de 100 cm³ avec de l'alcool méthylique au même titre.

Après avoir relevé la rotation de chacune des solutions (1 = 2), on les a additionnées de 0 gr.,60 d'émulsine, et on les a abandonnées à la température du laboratoire en ayant soin d'agiter de temps en temps.

Les examens polarimétriques de ces liquides ont été faits d'abord tous les quatre jours, puis tous les huit jours, et, à l'arrêt de la réaction, on a dosé, dans chacun d'eux, le glucose restant, ce qui a permis de trouver par différence la quantité de glucose passée à l'état de glucoside.

Le 71^e jour, la réaction s'étant arrêtée dans les quatre mélanges les moins riches en glucose, et s'étant fortement ralentie dans les autres, on a ajouté 0 gr.,50 d'émulsine dans chaque flacon, ce qui, d'après les recherches antérieures, ne pouvait avoir d'influence sur l'état d'équilibre final. Pour les quatre premiers mélanges, dans lesquels l'état d'équilibre était déjà atteint, cette addition de ferment n'a rien changé, tandis que, pour les autres, la réaction s'est poursuivie plus rapidement.

Dans le tableau suivant, on a donné, en regard des rotations initiale et finale de chaque mélange, la rotation

observée le 29^e jour, alors que l'état d'équilibre était atteint dans le premier mélange, afin de montrer où en était, à cette date, la réaction dans les autres mélanges. On a donné également à côté des quantités de glucose combiné au moment de l'arrêt, la proportion de ce sucre rapportée au poids du glucose existant primitivement dans la liqueur.

TABLEAU N° IX.

GLUCOSE pour 100	ROTATIONS (l=2)			GLUCOSE combiné	GLUCOSE combiné pour 100
	initiale	le 29 ^e jour	finale		
1 gramme..	+ 1°8'	— 26'	— 26'	0 gr.826	82 gr 60
2 — ..	+ 2°18'	— 44'	— 50' (1)	1, 652	82, 60
4 — ..	+ 4°40'	— 1°34'	— 1°40'	3, 304	82, 62
6 — ..	+ 7°4'	— 2°10'	— 2°30'	4, 970	82, 83
8 — ..	+ 9°28'	— 2°40'	— 3°20'	6, 620	82, 75
10 — ..	+ 11°54'	— 2°56'	— 4°8'	8, 270	82, 70
12 — ..	+ 14°10'	— 3°4'	— 4°50'	9, 870	82, 25
14 — ..	+ 16°42'	— 3°4'	— 5°36'	11, 420	81, 57
16 — ..	+ 19°	— 2°42'	— 6°14'	12, 990	81, 18
18 — ..	+ 21°30'	— 2°28'	— 7°	14, 602	81, 12
20 — ..	+ 23°5'	— 2°	— 7°40' (2)	16, 186	80, 90
30 — ..	+ 36°14'	+ 8°6'	— 11°10' (3)	23, 42	78
(1) Après 33 jours environ. (2) Après 84 jours environ. (3) Après 96 jours environ.					

Ces résultats établissent nettement que, dans un même alcool méthylique à 70°, toutes choses étant égales d'ailleurs, plus il y a de glucose en solution, plus il se fait de glucoside.

En particulier, il ressort, des chiffres inscrits dans la dernière colonne, que le rapport entre le glucoside formé et le glucose primitivement existant est sensiblement le même pour les six premiers mélanges (jusqu'à 12 p. 100). Il diminue ensuite assez lentement.

Ce fait, intéressant au point de vue théorique, l'est également au point de vue pratique, dans le cas où l'on voudrait préparer de grandes quantités de glucoside.

Ainsi, le calcul montre qu'en opérant avec 60 grammes d'émulsine dans 10 litres d'alcool méthylique à 70°, renfermant en solution 2.000 grammes de glucose, on obtiendra en un mois environ 1.463 grammes de méthylglucoside et en 84 jours environ 1.744 grammes. Il y a donc intérêt, pratiquement, à employer de fortes proportions de glucose.

Quoiqu'il en soit, tous ces résultats sont du même ordre que ceux que l'on obtient quand on effectue l'hydrolyse fermentaire des glucosides dans l'eau. D'après cela, on a été amené à rechercher si, comme on l'a établi pour les phénomènes hydrolytiques, l'arrêt de la réaction alors qu'elle n'est pas complète est dû à l'accumulation des produits formés.

Pour étudier cette question, on n'a fait que deux expériences, mais elles sont suffisamment démonstratives.

Après avoir préparé les deux solutions suivantes :

A.	Glucose.....	1 gr.
	Méthylglucoside β	1
	Alcool méthylique à 70° Q. S. p.....	100 cm ³ .
B.	Glucose	1 gr.
	Méthylglucoside β	3
	Alcool méthylique à 70° Q. S. p.....	100 mc ³

et avoir relevé leur rotation ($l = 2$), on les a additionnées chacune de 0 gr.,40 d'émulsine et on les a abandonnées en les agitant de temps en temps à la température du

laboratoire (+ 16° à + 20°), jusqu'à l'arrêt de la réaction qui a eu lieu pour A vers le 32^e jour et pour B vers le 26^e jour.

	Rotation initiale (1 = 2)	Rotation finale	Glucose restant à l'arrêt	Glucose combiné
A. Méthylglucoside β , 1 gr. + 30'	— 48'	0 gr.,291	0 gr.,709	
B. Méthylglucoside β , 3	— 48'	— 1°36'	0 gr.,608	0 gr.,392

Dans les mêmes conditions, sans addition de méthylglucoside, on a abouti (voir plus haut) à la combinaison de 0 gr.,826 de glucose. Il n'est donc pas douteux que l'arrêt de la réaction synthétisante est dû à l'accumulation d'une certaine quantité de méthylglucoside formée. Cette quantité n'est pas fixe pour un volume de liquide donné, mais, comme le montre le tableau de la page précédente, proportionnelle au glucose mis en œuvre.

On pouvait dès lors prévoir conformément d'ailleurs à la doctrine de la réversibilité, que, si l'on augmentait encore la proportion de méthylglucoside ajouté, à partir d'une certaine dose, facile à calculer, non seulement il n'y aurait plus de synthèse, mais il y aurait hydrolyse de façon à revenir à l'état d'équilibre correspondant au titre alcoolique. C'est ce qu'on a parfaitement constaté avec la solution suivante :

C. Glucose.....	1 gr.
Méthylglucoside β	7
Alcool méthylique à 70° Q. S. p.....	100 cm ³ .

qui a été comme les précédentes, additionnée de 0 gr.,40 d'émulsine et abandonnée à la température du laboratoire.

La rotation initiale qui était de — 3°34' a diminué par suite de l'hydrolyse du méthylglucoside β , et, au moment de l'arrêt de la réaction, cette rotation n'était plus que de — 3°10' et la proportion de glucose avait passé de 1 gramme à 1 gr.,212.

CHAPITRE VI.

Influence du phénol et de l'acide chlorhydrique sur l'action synthétisante de l'émulsine dans l'alcool méthylique.

I. ACTION DU PHÉNOL

MM. BOURQUELOT et BRIDEL ont essayé, à différentes reprises, la synthèse du phénol glucoside par l'émulsine, en opérant comme pour les alcoolglucosides. Ils ont toujours obtenu dans ces conditions, des résultats négatifs, ce qui pouvait être dû à l'action nocive du phénol sur l'émulsine.

C'est pour reconnaître quelle pouvait être la cause de ces insuccès, qu'ils m'ont chargé d'étudier l'action du phénol sur l'émulsine agissant comme ferment synthétisant dans une solution méthylique de glucose.

On a utilisé pour cela, l'alcool méthylique à 80 p. 100 dans lequel on peut dissoudre pour 100 cm³, jusqu'à 50 grammes de phénol.

Dans une première série d'essais, on a fait 10 solutions dans l'alcool méthylique à 80°, contenant pour 100 cm³, 1 gramme de glucose et 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 grammes de phénol. On a ajouté 40 centigrammes d'émulsine à chacune des solutions, et on les a abandonnées à la température du laboratoire en ayant soin de les agiter fréquemment.

On a suivi au polarimètre la marche de la synthèse, et

on a dosé le sucre réducteur restant à l'arrêt de la réaction.

On a constaté ainsi, que dans tous les liquides, l'émulsine agissait de la même façon et aussi rapidement qu'en l'absence de phénol.

C'est ainsi qu'en 8 jours, la rotation était de 0, et qu'en 40 à 48 jours, elle avait passé à $-32'$, ce qui est le point d'équilibre pour l'alcool méthylique à 80° (voir page 15). Il restait dans la solution 0 gr., 177 de glucose.

Le phénol en solution dans l'alcool méthylique à 80 p. 100, et jusqu'à 10 grammes pour 100 cm³, n'a donc aucune action nocive sur l'émulsine.

Dans une seconde série d'essais, on a employé la même proportion de glucose (1 gramme), mais des quantités beaucoup plus fortes de phénol (14 grammes, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 50).

Avec 14 grammes la réaction s'est poursuivie comme avec des doses plus faibles.

Avec 18 grammes de phénol, la réaction est allée moins vite; et on a atteint l'état d'équilibre en 2 mois environ, au lieu de 40 à 48 jours. Avec tous les autres liquides, on a pas atteint l'état d'équilibre, le phénol agissant comme destructeur du ferment. La réaction est allée d'autant moins loin qu'il y avait plus de phénol : avec 22 grammes la rotation à l'arrêt était égale à $-18'$; avec 30 grammes, à 0; avec 34 grammes à $+20'$, et avec 50 grammes à $+44'$; la rotation initiale étant pour tous ces liquides, $+16'$.

Il ressort donc de ces différents essais que le phénol en solution dans l'alcool méthylique, jusqu'à 14 à 18 grammes pour 100 cm³, n'empêche pas l'action synthétisante de l'émulsine; à des doses supérieures, son action nocive commence à se manifester, et l'émulsine est tuée avant que l'équilibre de la réaction soit atteint.

On a voulu savoir si, dans les premiers essais, c'était bien du méthylglucoside β qui s'était formé, comme l'indi-

quait d'ailleurs la rotation finale et la proportion de glucose restant. Pour cela on a réuni tous les liquides dans lesquels l'état d'équilibre avait été atteint ; on les a filtrés ; et on a distillé pour retirer l'alcool. Le phénol n'ayant pas été entraîné avec l'alcool, on a repris le résidu par 500 cm³ d'eau, et on a distillé de nouveau ; on a répété l'opération une seconde fois, et on a évaporé à sec sous pression réduite.

L'extrait obtenu a été épuisé à l'ébullition par 50 cm³ d'alcool à 95° ; on a filtré bouillant : la cristallisation était terminée en 24 heures. Les cristaux obtenus étaient légèrement colorés en jaune, on les a redissous dans 50 cm³ d'alcool à 95° bouillant, on a filtré, et, deux jours après, on a recueilli le produit qui pesait 3 gr., 26 et dont le pouvoir rotatoire était de $\alpha_D = -31^{\circ},85$.

$$(p = 0 \text{ gr.}, 3062 ; v = 15 ; l = 2 ; \alpha = -1^{\circ}18')$$

C'était donc bien du méthylglucoside β qui s'était formé dans l'alcool méthylique, en présence de phénol.

II. ACTION DE L'ACIDE CHLORHYDRIQUE

On sait que l'action hydrolysante de certains ferments est favorisée par une faible trace d'un acide tel que l'acide chlorhydrique, alors qu'elle est affaiblie par des quantités plus élevées.

On a voulu voir s'il en serait de même pour l'action synthétisante de l'émulsine.

Dans ce but, on a opéré avec une solution de glucose à 1 pour 100 dans l'alcool méthylique à 70°. Avec cette solution, on a préparé 7 mélanges renfermant respectivement pour 100 cm³ : un demi milligramme, 1 milligramme, 2, 4, 6, 8, et 10 milligrammes de gaz chlorhydrique.

Un huitième flacon servant de témoin, était constitué par une solution de glucose dans l'alcool, sans acide.

Dans ces 8 mélanges on a ajouté 0 gr.,40 d'émulsine, et on les a abandonnés à la température du laboratoire, en ayant soin de les agiter de temps en temps.

On a observé les rotations au polarimètre tous les deux jours, jusqu'à l'arrêt de la réaction, puis on a dosé le sucre réducteur restant.

La vitesse de la réaction n'a pas été accélérée par la présence de faibles quantités d'acide chlorhydrique. Le flacon sans acide, et les flacons renfermant 0,0005 et 0 gr.,001 milligramme d'acide ont toujours présenté des rotations identiques.

Avec des proportions plus fortes, la réaction a été légèrement retardée ; mais on a atteint encore assez rapidement l'état d'équilibre. Dans le témoin, il a fallu 18 jours environ, et dans les flacons à 2, 4, et 6 milligrammes, 24 à 28 jours.

Dans le flacon renfermant 8 milligrammes, le retard a été encore plus considérable ; il a fallu environ 2 mois ; et avec 10 milligrammes la réaction s'est arrêtée avant d'avoir atteint l'état d'équilibre.

En résumé, la présence de faibles quantités d'acide chlorhydrique (0,0005 et 0,001 milligramme) est sans action sur l'émulsine, ferment synthétisant. Si on augmente la proportion d'acide jusqu'à 0 gr.,008 milligrammes, la réaction est légèrement retardée ; mais avec 10 milligrammes on constate une nocivité très nette, comme cela a déjà été remarqué pour l'émulsine, ferment hydrolysant.

CHAPITRE VII.

Recherches sur la synthèse biochimique du méthylglucoside β dans un liquide neutre, étranger à la réaction ⁽¹⁾.

Il a été démontré que l'émulsine en poudre peut exercer son action hydrolysante sur les glucosides dissous dans des liquides neutres tels que l'acétone et l'éther acétique, bien que ces liquides ne dissolvent pas traces de ferment (2).

L'action hydrolysante de l'émulsine étant réversible, il était légitime de penser que ce ferment pourrait également, dans les liquides neutres, agir synthétiquement sur les composants des glucosides qu'elle hydrolyse. Mais pour qu'il en fût ainsi, il fallait que le liquide neutre employé comme véhicule fût capable de dissoudre ces composants (de dissoudre, par exemple, glucose et alcool méthylique pour la synthèse du méthylglucoside).

On ne pouvait donc pas espérer réussir avec l'éther acétique, non plus qu'avec l'acétone pur, anhydre, qui ne

(1) Em. BOURQUELOT et Em. VERDON. — Recherches sur la synthèse biochimique du méthylglucoside β dans un liquide neutre, étranger à la réaction (*Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), VI, p. 482, 1913, et *Comptes rendus, Ac. des Sciences*, T. CLVI, p. 1264, 1913).

(2) Em. BOURQUELOT et M. BRIDEL. — Action de l'émulsine sur la gentiopictine, en solution dans l'acétone et dans l'éther acétique (*Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), V, p. 534, 1912).

dissolvent pour ainsi dire pas de glucose. Mais il était tout indiqué de recourir à des acétones renfermant 10, 20 et même 30 p. 100 d'eau, d'autant plus que, dans ces acétones, l'hydrolyse, comme on l'a constaté, reste incomplète, ce qui ne peut se concevoir que par l'intervention de l'action synthétisante.

On a fait dans ces acétones deux séries d'essais :

• En premier lieu, on a employé de l'acétone à 20 p. 100 d'eau en poids. Avec cet acétone, on a fait à chaud une solution renfermant, pour 100 cm³, 2 grammes de glucose anhydre, solution qui, une fois refroidie, a servi à préparer les mélanges suivants :

I. —	Solution acétonique de glucose.....	80 cm ³
	Alcool méthylique absolu.....	5
	Acétone à 80 p. 100..... Q. S. p.	100
II. —	Solution acétonique de glucose.....	80 cm ³
	Alcool méthylique absolu.....	10
	Acétone à 80 p. 100..... Q. S. p.	100
III. —	Solution acétonique de glucose.....	80 cm ³
	Alcool méthylique absolu.....	15
	Acétone à 80 p. 100..... Q. S. p.	100
IV. —	Solution acétonique de glucose.....	80 cm ³
	Alcool méthylique absolu.....	20

Chacun de ces mélanges renfermait donc 1 gr.,60 de glucose ; mais les proportions d'alcool méthylique étaient entre elles comme 1, 2, 3 et 4.

Après avoir pris leur rotation initiale ($l=2$), on les a additionnés de 0 gr.,40 d'émulsine et on les a abandonnés à la température du laboratoire (+ 16 à + 18°).

Alcool méthylique pour 100 cm ³	Rotation ($l=2$).				Glucose combiné à l'arrêt
	Initiale	Après 5 jours	Après 9 jours	A l'arrêt de la réaction	
5 cm ³ ...	+ 1°54'	+ 1°2'	+ 50'	+ 48'	0 gr., 610
10	+ 1°56'	+ 40'	+ 26'	+ 16'	0 , 824
15	+ 1°58'	+ 28'	+ 4'	— 8'	0 , 992
20	+ 2°	+ 22'	— 6'	— 20'	1 , 129

Ces résultats démontrent, comme on l'avait prévu, que l'émulsine peut effectuer la synthèse d'un glucoside dans un liquide étranger à la réaction, et cela, pour l'acétone à 20 p. 100 d'eau, avec un rendement important, puisque, dans les quatre essais, ce rendement correspond respectivement à 38,1 ; 51,5 ; 62 et 70,5 p. 100 du glucose mis en œuvre.

Si le rendement a augmenté du premier au quatrième essai, cela ne peut tenir qu'à l'augmentation corrélatrice de l'alcool et à la diminution de l'eau, les autres facteurs étant restés les mêmes dans les quatre essais. L'acétone employé renfermant 20 parties d'eau pour 100 en poids, ce qui correspond à 17 gr.,5 pour 100 cm³, les quatre mélanges contenaient donc environ 16 gr., 6 ; 15 gr., 7 ; 14 gr., 8 et 14 grammes d'eau, de telle sorte que l'on peut considérer les mélanges comme constitués par des alcools méthyliques à 19,6 ; 34 ; 45 et 53,7 p. 100 en poids et de l'acétone anhydre. Or, si l'on se reporte à la courbe qu'on a tracée pour représenter l'action de l'émulsine sur le glucose en solution dans des alcools méthyliques de différents titres (voir page 17), on verra que, pour ces alcools, le rendement correspond à des proportions de glucose très rapprochées de celles qui ont été glucosidifiées dans l'acétone.

Dans la seconde série d'essais, on a employé de l'alcool méthylique composé en poids de 70 parties d'alcool et 30 parties d'eau avec lequel, on a fait, à chaud, une solution renfermant, pour 100 cm³, 5 grammes de glucose.

Après refroidissement, on a préparé les mélanges suivants :

A. — Solution méthylique de glucose.....	50 cm ³
Acétone pur	50
B. — Solution méthylique de glucose.....	50 cm ³
Alcool méthylique à 70c.....	50

Ces mélanges renfermaient donc la même quantité de glucose (2 gr, 50 p. 100) ; mais le second (B), renfermait deux fois autant d'alcool méthylique et d'eau que le premier qui, seul, contenait de l'acétone (volume égal). On a ajouté 0 gr., 40 d'émulsine à chaque mélange et on les a abandonnés à la température du laboratoire.

Voici les résultats de ces deux essais :

	Rotation ($l=2$)				Glucose combiné à l'arrêt
	Initiale	Après 6 jours	Après 12 jours	A l'arrêt	
A (acétone)...	+ 2°58'	+ 1°20'	+ 6'	— 1°4'	2 gr. 061
B	+ 2°58'	+ 1°6'	± 0	— 1°4'	2 , 061

Ainsi, bien que la réaction ait marché plus lentement d'abord dans l'essai A (acétone), la limite atteinte a été la même dans les deux cas. On remarquera que le rapport de l'eau à l'alcool méthylique était également le même dans les deux essais. Le liquide neutre, dans lequel on effectue la synthèse biochimique est donc sans influence sur l'état d'équilibre final. La réaction est seulement ralentie, en raison, sans doute, de l'écartement des molécules.

Dans leurs recherches sur les affinités de la formation et de la décomposition des éthers, BERTHELOT et PÉAN de SAINT-GILLES (1) ont essayé à 100° l'éthérification d'un mélange équivalent d'acide acétique et d'alcool, d'une part, directement, et, d'autre part, en dissolution dans quatre volumes de benzine environ. La réaction a été fortement ralentie dans la benzine, mais finalement, elle a abouti, dans les deux cas, à la même quantité d'acide éthérifié (60,6 p. 100 dans le mélange normal et 60,8 p. 100 dans le mélange avec la benzine), c'est-à-dire au même état d'équilibre. Ce sont là des faits en tous points

(1) Etat de dissolution dans un menstrue étranger à la réaction (*Ann. de Chim. et de Phys.*, (3), LXVI, p. 61, 1862).

semblables à ceux qui ont été constatés dans les expériences avec l'acétone. Ces derniers montrent donc, une fois de plus, l'analogie qui existe entre la glucosidification et l'éthérification.

Afin de ne laisser place à aucun doute dans les conclusions des essais qui viennent d'être exposés, on a procédé à l'extraction du glucoside formé. Pour cela, on a mélangé les liquides et on les a distillés à sec sous pression réduite. On a dissous l'extrait dans 80 cm³ d'eau, on a ajouté 2 grammes de levure haute (levure des boulangers) pour détruire le glucose restant et on a abandonné le tout à la température du laboratoire. La fermentation terminée, le liquide a été filtré, additionné d'un peu de carbonate de calcium et filtré de nouveau. On a évaporé à sec et finalement repris, à l'ébullition, le résidu qui pesait 3 grammes, par 20 cm³ d'alcool à 95°. La cristallisation s'est faite en quarante-huit heures. On a obtenu 1 gr.,62 de produit cristallisé, dont le pouvoir rotatoire était de $\alpha_D = -32^{\circ},46$.

($p = 0$ gr., 2540 ; $v = 15$; $l = 2$; $\alpha = -1^{\circ}6'$)

C'était donc bien du méthylglucoside β .

Ces résultats ne présentent pas seulement un intérêt théorique, ils présentent aussi de l'importance au point de vue de l'application du procédé biochimique de synthèse des glucosides aux alcools solides qui ne fondent qu'à une température où les ferments sont détruits. On conçoit qu'en dissolvant ces alcools dans de l'acétone plus ou moins chargée d'eau, on obtienne des liquides qui se prêteront à la dissolution du glucose et, par conséquent, à la réalisation de la synthèse des glucosides de ces mêmes alcools.

Une précaution indispensable dans les essais avec l'acétone, et sur laquelle on doit insister spécialement, est de s'assurer que ce liquide est bien de l'acétone préparée avec la combinaison bisulfite, c'est-à-dire de l'acétone ne renfermant pas d'alcool méthylique ; sans quoi on pour-

rait attribuer à l'alcool étudié une réaction qui proviendrait, en partie ou en totalité, de l'alcool méthylique existant comme impureté. On peut essayer l'acétone de la façon suivante : On fait dissoudre 1 gramme de glucose pur dans 100 ^{cm}³ de cet acétone étendu de 1/5 d'eau en poids et on ajoute 0 gr.,20 d'émulsine. Si cet acétone renferme de l'alcool méthylique, ou d'une façon générale, un alcool, la rotation baissera. Une diminution de 3 à 4' est sans importance ; mais si elle est de 14 à 20', comme on l'a trouvée avec un acétone suspect, celui-ci est à rejeter.

CHAPITRE VIII.

Des meilleures conditions pour préparer le méthylglucoside β .

On a vu dans le Chapitre V, qu'il est possible de préparer de fortes proportions de méthylglucoside β à l'aide de l'émulsine.

Dans quelles conditions faut-il opérer, et avec quel alcool ?

On a employé l'alcool à 70°. C'est en effet cet alcool qui se prête le mieux à la préparation en grand du méthylglucoside β , et non pas des alcools plus forts, à 80°, 90° et 95°, bien que, dans ces derniers, d'après les essais faits sur 1 gramme de glucose dans 100 cm³, la combinaison aille plus loin, puisqu'il reste à l'arrêt respectivement 0 gr., 117, 0 gr., 062 et 0 gr., 046 de glucose au lieu de 0 gr., 174 dans l'alcool à 70° (voir tableau de la page 15), mais la synthèse ne s'opère que très lentement, et, pour un même laps de temps, un mois environ, on combine plus de glucose dans l'alcool à 70°.

Si l'on se reporte maintenant au tableau n° IX (page 36) on voit qu'au bout de 29 jours, dans la solution renfermant 20 gr. p. 100 cm³ de sucre, il y a eu un changement de rotation de 25°5', ce qui correspond à la synthèse de 14 gr., 63 de méthylglucoside β , et dans la solution renfermant 30 gr. p. 100 cm³ de sucre, un changement de 28°8', correspondant à la formation de 16 gr., 52 de glucoside.

C'est donc en employant 30 grammes de glucose pour 100 cm³, qu'on obtiendra le meilleur rendement après un mois.

On a essayé, en conséquence, de préparer une assez forte quantité de méthylglucoside β dans ces conditions.

Dans une première expérience, on a mis en œuvre 250 cm³ d'alcool à 70°, 75 grammes de glucose en poudre et 1 gr., 50 d'émulsine. On n'a pas dissous le glucose dans l'alcool avant d'ajouter le ferment. On a remarqué qu'en opérant ainsi, la réaction s'effectuait bien, mais plus lentement que si on avait eu soin de dissoudre le sucre au préalable.

C'est pourquoi, dans les autres expériences, on a opéré de la façon suivante :

Glucose pur.....	150 grammes.
Alcool méthylique à 70°..	Q. S. p. 500 cm ³ .
Emulsine.....	3 grammes.

On a fait quatre flacons sembiabiles.

On a dissous le sucre à chaud dans 350 cm³ environ d'alcool à 70° et, après refroidissement, on a complété le volume à 500 cm³ avec de l'alcool au titre.

Il a fallu employer, pour obtenir un volume de 500 cm³, 425 cm³ d'alcool à 70°, si bien que le mélange était formé pour 500 cm³ de :

Glucose.....	150 grammes.
Alcool méthylique pur.....	254 —
Eau distillée.....	109 —

On a ajouté dans chaque flacon 3 grammes d'émulsine, et on les a abandonnés à la température du laboratoire (+ 16° +19°), en ayant soin de les agiter de temps en temps.

La rotation initiale qui était de + 36°14' a passé en un mois à + 6°34' soit un changement de rotation de 29°40', correspondant à la synthèse de 17 gr., 42 de méthylglu-

coside β pour 100 cm³ de liquide, soit dans les 2 litres : 348 gr.,40.

On doit remarquer que la synthèse a été un peu plus forte dans le même temps, que dans la première expérience avec 30 grammes de glucose dissous au préalable, dans laquelle il ne s'était fait que 16 gr.,52 de glucoside. Cela est dû à ce qu'on a employé dans le premier cas 0 gr.,50 pour 100 d'émulsine et dans le second 0 gr.,60.

On a filtré les mélanges au bout d'un mois, on a distillé pour retirer l'alcool et on a dissous l'extrait obtenu dans l'eau distillée. On a ajouté à la solution 20 grammes de levure fraîche (levure des boulangers) et on a laissé fermenter.

La fermentation terminée (au bout de 7 jours environ), on a filtré, on a fait bouillir la liqueur en présence de carbonate de calcium afin de neutraliser les acides formés; on a filtré de nouveau, on a réuni tous les liquides, et on a évaporé le tout sous pression réduite.

L'extrait obtenu a été épuisé par l'alcool à 95° bouillant.

Le méthylglucoside β a cristallisé presque aussitôt.

Au bout de deux ou trois jours, on l'a recueilli, et on l'a fait sécher.

On a obtenu de la sorte 250 grammes de méthylglucoside β pur, dont le pouvoir rotatoire est de : $\alpha_D = -32^\circ,56$.

$$(p = 0,3993 ; l = 2 ; v = 15 ; \alpha = -1^\circ 44')$$

CONCLUSIONS.

Voici les principales conclusions que l'on peut tirer de ce travail :

1° L'émulsine hydrolyse la salicine en solution dans l'alcool méthylique, quel que soit le titre, depuis l'alcool à 10 p. 100 jusqu'à l'alcool à 95 p. 100.

2° Dans des alcools méthyliques de différents titres contenant en solution 1 gramme de glucose p. 100, l'émulsine détermine une synthèse d'autant plus forte que l'alcool est plus élevé.

3° La quantité d'émulsine mise en œuvre n'a aucune influence sur la limite de la réaction ; elle en accélère seulement la vitesse ; néanmoins, il faut opérer avec suffisamment de ferment, celui-ci étant détruit très lentement par un contact prolongé avec l'alcool méthylique.

4° C'est à la température de $+16^{\circ}$ $+19^{\circ}$ que la synthèse se réalise le mieux. A des températures plus élevées, l'émulsine est détruite peu à peu.

5° Plus on dissout de glucose dans l'alcool, plus la réaction va loin, et plus il se fait de glucoside. Jusqu'à 12 grammes p. 100, le rapport entre la quantité de glucoside formé et le glucose mis en œuvre est sensiblement le même.

Avec des quantités plus élevées de sucre, ce rapport diminue, le méthylglucoside β formé restant en solution empêche la réaction de se continuer.

6° Le phénol, depuis 1 gramme jusqu'à 18 grammes, en solution dans 100 cm³ d'alcool méthylique, n'a aucune

influence sur la synthèse du méthylglucoside β , son action nocive commence à s'exercer sur l'émulsine à partir de 24 grammes pour 100 cm³.

7° L'action synthétisante de l'émulsine se poursuit normalement, c'est-à-dire n'est ni accélérée ni retardée par de faibles doses d'acide chlorhydrique (depuis 0,0005 jusqu'à 0,001 milligr. d'acide pour 100 cm³ d'alcool méthylique) ; mais elle est retardée avec des quantités plus fortes, jusqu'à 0,008 p. 100, et elle s'arrête avant d'avoir atteint l'état d'équilibre, lorsqu'on ajoute 0 gr., 01 d'acide chlorhydrique pour 100.

8° Dans un liquide neutre étranger à la réaction : l'acétone, la synthèse du méthylglucoside β s'effectue régulièrement, à condition toutefois que ce liquide renferme assez d'eau pour dissoudre le glucose.

9° C'est dans l'alcool méthylique à 70 p. 100, contenant en solution 30 grammes de glucose pour 100 cm³ et 0 gr., 60 d'émulsine à la température de + 16° + 19°, qu'on obtient pratiquement le meilleur résultat. La réaction, qui se fait très vite au début, se ralentit au bout d'un mois, et à partir de ce moment la quantité de glucoside formé est très faible ; on n'a donc pas d'intérêt à attendre la fin de la réaction pour retirer le produit.

Vu, bon à imprimer ;

Vu :

Le Président de Thèse,

Le Directeur de l'Ecole,

Em. BOURQUELOT.

H. GAUTIER.

Vu et permis d'imprimer :

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,

L. LIARD.

TABLE DES MATIÈRES.

	pages
Introduction.....	1

CHAPITRE PREMIER.

Action de l'émulsine sur la salicine en solution dans des alcools méthyliques de différents titres.....	9
---	---

CHAPITRE II.

Etude de l'action synthétisante de l'émulsine dans des alcools méthyliques de différents titres.....	14
--	----

CHAPITRE III.

Variations des proportions d'émulsine.....	21
--	----

CHAPITRE IV.

Variations de la température.....	26
-----------------------------------	----

CHAPITRE V.

Variations des proportions de glucose. — Influence des produits de la réaction sur l'arrêt de celle-ci.....	34
---	----

CHAPITRE VI.

Influence du phénol et de l'acide chlorhydrique sur l'action synthétisante de l'émulsine dans l'alcool méthylique	39
---	----

I. Action du phénol.	39
II. Action de l'acide chlorhydrique.....	41

CHAPITRE VII.

Recherches sur la synthèse biochimique du méthylglucoside β dans un liquide neutre, étranger à la réaction.	43
---	----

CHAPITRE VIII.

Des meilleures conditions pour préparer le méthylglucoside β	49
Conclusions.....	53

